

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЛОХ
XENOPSYLLA CHEOPIS, ЗАРАЖЕННЫХ
ЧУМНЫМИ МИКРОБАМИ УЛЭГЕЙСКОГО ПОДВИДА
YERSINIA PESTIS ULEGEICA

В. С. Ващенко, В. Н. Якуба, М. П. Маевский

Зоологический институт АН СССР, Ленинград; Иркутский государственный
научно-исследовательский противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока

Чумной микроб улэгейского подвида способен вызывать устойчивое заражение блох *X. cheopis*, сопровождающееся образованием «блока» у значительной части особей. Характерной чертой переживания возбудителя в этих эктопаразитах является непостоянство его численности, претерпевающей циклические изменения, обусловленные ритмом питания и пищеварения. На начальной стадии переваривания крови, пока в кишечнике содержатся сгустки эритроцитов, происходит размножение микробов. По мере переваривания крови оно сменяется их отмиранием, а после окончания пищеварения численность возбудителя восстанавливается. Преобладающей формой микробов в этот период являются мелкие коккобактерии, образующие в преджелудке и средней кишке плотные комки и сгустки.

Применение гистологических методов в изучении взаимоотношений блох с чумным микробом позволило получить в последние годы ряд новых данных о микроскопической структуре «блока», «блокообразовании», изменениях морфологии микробных клеток и закономерностях развития популяции возбудителя в организме переносчика (Ващенко и др., 1972; Бейер и др., 1974; Гончаров и др., 1974; Щедрин, 1974, Щедрин и др., 1975; Ващенко, Тараканов, 1977; Savanaugh, 1971). Вместе с тем подобные исследования проведены на небольшом числе видов блох с использованием очень ограниченного набора штаммов возбудителя. Учитывая это, а также целесообразность изучения особенностей переживания в блохах различных штаммов чумного микроба, циркулирующих в природе и отличающихся по свойствам и систематическому положению, нами было проведено гистологическое исследование блох *Xenopsylla cheopis* Roths., зараженных возбудителем чумы улэгейского подвида (*Yersinia pestis ulegeica*). Культуры этого микроба впервые были выделены в 1972 г. от монгольских пищух и их блох в западной Монголии. Вначале они рассматривались как атипичные штаммы чумного микроба алтайского подвида, а затем этот возбудитель на основании биохимических и биологических свойств и приуроченности к определенной территории был отнесен к самостоятельному подвиду (Тимофеева и др., 1975; Тимофеева, Логачев, 1978).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В опытах использовали лабораторную культуру блох *X. cheopis*, которые после вышлюда в течение 2 суток находились на белой мыши, а перед заражением выдерживались 2—3 суток без питания. Эктопаразитов заражали кормлением на биопробных животных (белые мыши), которым вводилась подкожно 2-суточная агаровая культура возбудителя чумы в дозе 100 тыс. микробных клеток. Блох выпускали на биопробных живот-

ных в период развития у них бактериемии, когда в мазках взятой из периферийных сосудов крови отмечалось не менее 10—20 микробов в каждом поле зрения микроскопа. Через 2—3 ч эктопаразитов снимали, просматривали в микроскоп, отбирали напившихся и содержали в банках с опилками при 20—23°, подкармливая через 2—3 суток. Часть блох после 2-й и 3-й подкормок была отделена от основной группы и в дальнейшем содержалась без питания. Фиксацию блох (жидкость Карнуа) проводили через 2, 7, 11, 24 и 48 ч после заражения и через 1.5—4 ч и затем ежедневно — после подкормок. Эктопаразиты, содержащиеся после 2-й и 3-й подкормок без питания, фиксировались 1 раз в сутки в течение 11 дней.

Из зафиксированного материала готовили парафиновые срезы толщиной 4—7 мкм, которые окрашивали по Романовскому-Гимза с ацетоновой проводкой (Ващенко, Тараканов, 1977).

Применявшийся для заражения блох штамм чумного микроба (И-2422) был выделен в 1974 г. в Баян-Улэгейском аймаке Монгольской Народной Республики от блох монгольской пищухи и имел типичные для улэгейского подвида свойства. Он был вирулентен для белых мышей (LD₅₀ — 91 микробная клетка) и слабо вирулентен для морских свинок, ферментировал рамнозу и арабинозу и давал рост на минимальной среде Берроуза и Бекона в присутствии метионина, цистина и фенилаланина.

Физиологическое состояние пищеварительного тракта оценивалось по выделенным ранее 3 стадиям переваривания крови (I—III; Ващенко и Солина, 1969). Последнюю стадию, наступление которой связывается с превращением крови в конечный продукт переваривания — гематин, до истечения суток после питания рассматривали как раннюю III (III_р), а после этого срока как позднюю III (III_п; см. таблицу).

Всего было исследовано 215 гистологических препаратов блох, преимущественно самок. Из них возбудитель чумы был обнаружен у 168 особей.

Частота обнаружения чумных микробов в разных отделах кишечника экспериментально зараженных блох *X. cheopis* (20—23° С)

Стадия переваривания крови	Исследовано блох	Из них выявлено зараженных	Число блох с микробами в следующих отделах кишечника				
			пищевод	преджелудок	средняя кишка	тонкий кишечник	ректальная ампула
После заражающего кормления							
I	21	21	12	21	21	6	9
II	12	11	5	11	11	5	6
III _р	8	6	0	6	5	0	1
III _п	10	10	2	10	10	0	3
Итого	51	48	19	48	47	11	19
После подкормок							
I	19	18	3	18	17	3	3
II	16	9	1	8	8	0	0
III _р	25	16	2	15	14	3	3
III _п	95	69	26	69	64	12	15
Итого	155	112	32	110	103	18	21

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании гистологических препаратов, приготовленных из блох, зафиксированных в первые 2—3 ч после заражающего кормления, чумные микробы были обнаружены у всех особей и во всех отделах пище-

варительного тракта, где содержалась непереваренная кровь. Возбудитель при этом постоянно отмечался в преджелудке и в средней кишке, более чем у половины насекомых он был выявлен также в проксимальной части пищевода и довольно часто присутствовал в тонкой кишке и ректальной ампуле (см. таблицу). Микробы имели при этом форму палочек с закругленными концами 2—3 мкм в длину и 0.5—1 мкм в ширину и нередко окрашивались биполярно. В содержимом кишечника они располагались поодиночке или цепочками из 2—6 клеток, образуя беспорядочную редкую россыпь (см. рисунок, 1—3).

У блох, зафиксированных на 2—3 ч позднее, микробы в преджелудке и средней кишке, а отчасти и в проксимальной части пищевода становились более многочисленными. Они нередко группировались в рыхлые скопления или образовывали длинные извитые цепочки, сохраняли при этом форму палочек и часто биполярную окраску (см. рисунок, 4, 5). Вместе с тем возбудитель реже выявлялся в задних отделах пищеварительного тракта. Это отчасти было связано с выведением бактерий при дефекации. Кроме того, нужно отметить, что даже при наличии в ректальной ампуле непереваренной крови значительных скоплений микробов здесь не наблюдалось. При этом они слабее, чем в средней кишке и преджелудке, окрашивались в синий цвет и часто принимали форму овоидов или мелких неправильных гранул.

Значительные скопления микробов в преджелудке и в средней кишке наблюдались в течение всей I стадии переваривания крови, пока в кишечнике сохранялись сгустки эритроцитов. По мере их распада, сопровождающегося разрушением кровяных клеток и превращением содержимого в однородную крупнозернистую массу, количество микробов начинало уменьшаться. Их отмирание происходило более интенсивно в периферийных слоях, чем в центральных. Этот процесс сопровождался изменением формы микробов. Наряду с палочками появлялись овоидные и шаровидные формы с диаметром 1—2 мкм, которые затем превращались в мелкие коккобактерии размером не более 0.5 мкм.

Наименьшая численность возбудителя наблюдалась к концу переваривания крови, когда содержимое кишечника переставало окрашиваться в розовый цвет и принимало буровато-золотистую окраску, превращаясь в гематин (III стадия). У большинства блох это происходило к исходу суток после заражающего кормления. В это время удавалось обнаруживать лишь отдельные клетки микробов или их небольшие сгустки. В преджелудке они обычно располагались у оснований усаживающих его внутреннюю стенку хитиновых игл или акантов (Richards a. Richards, 1969), а в средней кишке, если обнаруживались, находились в толще гематина. Микробы обычно имели форму очень мелких коккобактерий. На этот же период приходилось наименьшее число блох, у которых при исследовании гистологических препаратов обнаруживался возбудитель.

К исходу 2 суток, а у некоторых особей и раньше, численность микробов начинала возрастать. Ко времени 1-й подкормки, проводившейся на 3-и сутки, значительные скопления мелких палочек и коккобактерий отмечались в преджелудке. Последний, как правило, был заполнен буровой массой гематина, а микробы образовывали плотные комки, располагавшиеся преимущественно по стенкам преджелудка у оснований акантов. Отсюда тонкими тяжами сгустки микробов проникали в проксимальную часть пищевода и на стенки кардиального клапана. Реже небольшие комочки бактерий отмечались в гематине в центральной части преджелудка. В средней кишке возбудитель выявлялся в виде редкой россыпи мелких палочек и коккобактерий или их небольших рыхлых скоплений. Следует отметить, что, помимо окрашенных в синий цвет микробов, в преджелудке и в средней кишке нередко можно было наблюдать имевшие такую же форму, но не окрашенные (бурые) или очень слабого синего оттенка гранулки, представлявшие, по-видимому, тела отмерших бактерий.

В задних отделах кишечника микробы обычно отсутствовали и лишь у отдельных экземпляров выявлялись в виде очень скудной россыпи бледно окрашенных палочек и коккобактерий.

При подкормке эктопаразитов часть микробов вместе с гематином, оставшимся от предыдущего питания, могла вымываться током насасываемой крови из передних и задних отделов кишечника, выводиться в ректум и затем выбрасываться наружу. Вместе с тем у свеженапившихся зараженных блох всегда наблюдались отчетливо различимые плотные скопления мелких коккобактерий у оснований акантов в преджелудке и рассеянные в содержимом средней кишки разных размеров комки, состоявшие из таких же коккобактерий (см. рисунок, 6, 7). Микробы постепенно увеличивались в размерах, у них появлялась биполярная окраска, они принимали боченкообразную, а затем палочковидную форму. Комки при этом разрыхлялись и давали все более обильную россыпь отдельных клеток и коротких цепочек, располагающихся как в центре комка, так и в непосредственной близости от эпителиальных клеток. Судя по всему, как и после заражающего кормления, на начальном этапе переваривания крови, пока в содержимом оставались сгустки эритроцитов, происходило размножение микробов, которое с наступлением II стадии сменялось отмиранием их популяции, а после окончания пищеварения вновь происходило накопление возбудителя.

При последующих подкормках цикл повторялся с той разницей, что накопление микробов после переваривания крови происходило более интенсивно. У значительной части особей, помимо больших скоплений в преджелудке и в области кардиального клапана, в средней кишке образовывались крупные плотные комки из смеси гематина и сгустков мелких коккобактерий (см. рисунок, 8). При подкормке такой комок не распадался и мог оставаться в средней кишке. У свеженапившихся блох он занимал обычно в полости желудка центральное положение и был окружен со всех сторон массой эритроцитов. По мере переваривания крови комок постепенно разрыхлялся, но небольшие его остатки с отчетливо красящимися микробами могли оставаться до конца пищеварения.

В партиях блох, отделенных после 1-й и 2-й подкормок от основной группы эктопаразитов и содержащихся в дальнейшем без питания, начинавшееся по окончании пищеварения нарастание обилия микробов отчетливо прослеживалось до 4—6-го дня после кровососания. Микробы при этом сохраняли форму коккобактерий или очень мелких палочек. В преджелудке они заполняли плотными сгустками промежутки между акантами, образовывали такие же плотные сгустки в передней части его полости, откуда могли продолжаться в пищевод, если там содержались остатки крови или гематин. Обильные скопления бактерий у некоторых насекомых прослеживались до заднеглоточного насоса. Из задней части преджелудка микробная масса прорастала в область кардиального клапана, заполняя его полость сплошным плотным комком.

В средней кишке накопление микробной массы начиналось обычно во внешних слоях оставшихся после переваривания крови скоплений гематина (см. рисунок, 9), а затем, постепенно разрастаясь внутрь, она могла образовать большой плотный сгусток коккобактерий, составляющий основное содержимое средней кишки.

В тонкой кишке и ректальной ампуле возбудитель обнаруживался у небольшого числа особей. При этом значительных скоплений микробов не отмечалось.

Большие скопления микробов, хорошо красящихся в синий цвет и имеющих четко очерченную форму мелких коккобактерий, у большинства эктопаразитов можно было наблюдать на 8—9-й день после подкормки. Позднее этого срока микробная масса постепенно утрачивала способность окрашиваться, превращаясь в скопления мелких гранул желтого или буроватого цвета. У эктопаразитов, зафиксированных на 10—11-е сутки после последнего питания (предельные сроки наблюдений), плотные массы таких гранул, сохранявших при этом форму кокко-

бактерий, составляли основное содержимое преджелудка, кардиального клапана и полости средней кишки. Отчетливо различимые микробы, окрашенные в синий цвет, обнаруживались в виде небольших сгустков у самого основания акантов в преджелудке и реже — в центральных слоях содержимого средней кишки. Эти изменения, вероятно, были связаны с отмиранием микробной популяции в связи с истощением питательного субстрата и, возможно, с накоплением продуктов метаболизма.

Характерно, что в небольшой группе блох, содержавшихся после 2-й подкормки при пониженной температуре (5°), с первых же суток происходило постепенное непрерывное нарастание обилия возбудителя. Причем в первые 2—3 дня превалировали палочки, затем они превращались в мелкие коккобактерии, которые образовывали массивные комки и сгустки не только в преджелудке и средней кишке, но также в тонком отделе кишечника и в ректальной ампуле.

В условиях периодической подкормки эктопаразиты постепенно освобождались от возбудителя. Учитывая результаты просмотра блох на I и поздней III стадиях переваривания крови, когда особенно легко выявлялись инфицированные особи, их доля (при 100%-ной исходной зараженности) после 1-й подкормки составляла $91.4 \pm 4.7\%$ и при последующих соответственно 78.8 ± 7.1 , 73.9 ± 9.1 и $70.0 \pm 10.2\%$. В группе блох, содержавшихся без питания, в течение всего 11-дневного периода наблюдений процент инфицированных особей находился в пределах 90.0—93.3.

Начиная с 1-й подкормки и при всех последующих часть блох оказалась не в состоянии напиться из-за закупорки («блокирования») преджелудка сгустками размножившихся микробов. Кровь, дойдя до его переднего отдела, реже до середины, останавливалась (см. рисунок, 10, 11). Часть микробов при этом отрывалась от сгустков и переходила в кровь (рис. 12). Отдельные микробные клетки можно было проследить на всем протяжении пищевода и глотки. В дальнейшем кровь, содержащаяся в передних отделах пищевой трубки, свертывалась, а через 2—3 дня замещалась сгустками размножившихся микробов.

У некоторых особей заполненность пищевода кровью и связанная с этим типичная картина «блокирования» наблюдалась при наличии небольших количеств свежей крови в средней кишке. Следует полагать, что в таких случаях закупорка передних отделов возникала у блох во время кровососания и могла быть связана с выпадением фибрина при прохождении крови через преджелудок, забитый скоплениями микробов и плотными массами гематина. По всей вероятности, комки микробов в преджелудке, даже если они и не обеспечивают его полную непроходимость, затрудняют нормальное питание блох, с чем, по-видимому, связано возрастающее с каждой подкормкой число ненапившихся или слабонапившихся особей.

Нужно также отметить, что у отдельных блох закупорка преджелудка вызывалась скоплениями, судя по всему, отмерших микробов, не окрашивавшихся в синий цвет даже в местах непосредственного соприкосновения с кровью. Это может объяснить нередко отмечаемое явление, когда наличие «блока» у эктопаразитов не сопровождалось передачей ими инфекции при питании.

От общего числа исследованных блох «блокированные» составили приблизительно 20%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали, что чумной микроб ульгейского подвида способен вызывать устойчивое заражение блох *X. cheopis*. В условиях периодической подкормки, проводившейся через 2—3 дня и при температуре $20\text{—}23^{\circ}$ до конца срока наблюдений, составившего 15 дней, 70% эктопаразитов оставались зараженными. При этом после 1-й же подкормки (на 3-и сутки после заражения) обнаружены «блокированные» особи, а общий процент «блокированных» от числа исследованных — 20.

Установлено также, что общие закономерности развития микробной популяции имели значительное сходство с наблюдавшимися ранее у блох этого же вида (Щедрин, 1974) и у *X. gerbilli minax* (Ващенко и Тараканов, 1977), зараженных другими штаммами возбудителя чумы.

Характерной чертой переживания чумных микробов в блохах, как показывают наблюдения, является непостоянство их численности, претерпевающей циклические изменения, обусловленные ритмом питания насекомых и течением пищеварительного процесса. При этом сразу же после кровососания происходит размножение микробов, продолжающееся в течение всей 1-й стадии переваривания крови, пока в средней кишке сохраняются слюски эритроцитов. По мере переваривания крови их размножение прекращается, сменяясь отмиранием, а после окончания пищеварения численность возбудителя восстанавливается. Преобладающей формой микробов в этот период являются мелкие коккобактерии, образующие в преджелудке и в средней кишке по мере накопления плотные комки. При длительном голодании отчетливый рост микробной массы прослеживался до 4—6 суток, а затем начиналось вторичное отмирание популяции возбудителя, обусловленное, по-видимому, истощением питательной среды и накоплением продуктов метаболизма.

Наиболее критическим периодом переживания чумного микроба в организме периодически подкармливаемых блох *X. cheopis* являются II и начало III стадий переваривания крови. В этот период, судя по всему, может происходить освобождение эктопаразитов от инфекции, а образование «блока» связано с размножением микробов после окончания пищеварительного процесса.

Л и т е р а т у р а

- Бейер А. П., Акиев А. К., Суворова А. Е. 1974. Морфология вирулентного чумного микроба в организме блох *Xenopsylla cheopis*. — Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 6 (40) : 60—63.
- Ващенко В. С., Гончаров А. П., Елкин Ю. М., Осипова С. П. 1972. Опыт гистологического исследования блох *Xenopsylla cheopis*, блокированных чумным микробом. — Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 4 (26) : 157—158.
- Ващенко В. С., Солина Л. Т. 1969. О пищеварении у блох *Xenopsylla cheopis* Roths. (Aphaniptera, Pulicidae). — Паразитология, 3 (5) : 451—460.
- Ващенко В. С., Тараканов Н. Ф. 1977. Влияние пищеварительного процесса на переживание возбудителя чумы в блохах *Xenopsylla gerbilli minax*. — Паразитология, 11 (6) : 474—479.
- Гончаров А. П., Елкин Ю. М., Локтев Н. А., Осипова С. П. 1974. Об изменениях в преджелудке блох *Nosopsyllus consimilis* и *Callopsylla caspica*, инфицированных чумой. — Паразитология, 8 (4) : 348—352.
- Тимофеева Л. А., Логачев А. И. 1978. *Yersinia pestis ulegeica* — новый подвид чумного микроба, выявленный в МНР. — В кн.: «Эпидемиология и профилактика особо опасных инфекций в МНР и СССР», Улан-Батор : 64—67.
- Тимофеева Л. А., Логачев А. И., Сотникова А. Н., Горбатов Н. А., Идеш Д. 1975. Об атипичных штаммах чумного микроба, выделенных в очагах Горного Алтая и Монголии. — В кн.: «Международные и национальные аспекты эпиднадзора при чуме». Иркутск: 134—136.
- Щедрин В. И. 1974. Морфологические и гистохимические данные по перевариванию крови у некоторых видов блох — переносчиков чумы. Автореф. канд. дис. Саратов: 3—26.
- Щедрин В. И., Бейер А. П., Локтев Н. А., Акиев А. К. 1975. Морфологическое и гистохимическое исследование блох *X. cheopis* Roths., зараженных чумными микробами. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1 : 86—89.
- Savannah D. C. 1971. Specific effect of temperature upon transmission of the plague bacillus by rat flea, *Xenopsylla cheopis*. — Am. Journ. Trop. Med., 20 (2) : 264—273.
- Richards P. A. a. Richards A. G. 1969. Acanthae: a new type of cuticular process in proventriculus Mecoptera and Siphonaptera. — Zool. Jb. Anat., 86 (2) : 158—176.

HYSTOLOGICAL STUDIES OF FLEAS OF XENOPSYLLA
CHEOPIS INFECTED WITH PLAGUE MICROBES OF THE ULEGEI
SUBSPECIES, YERSINIA PESTIS ULEGEICA

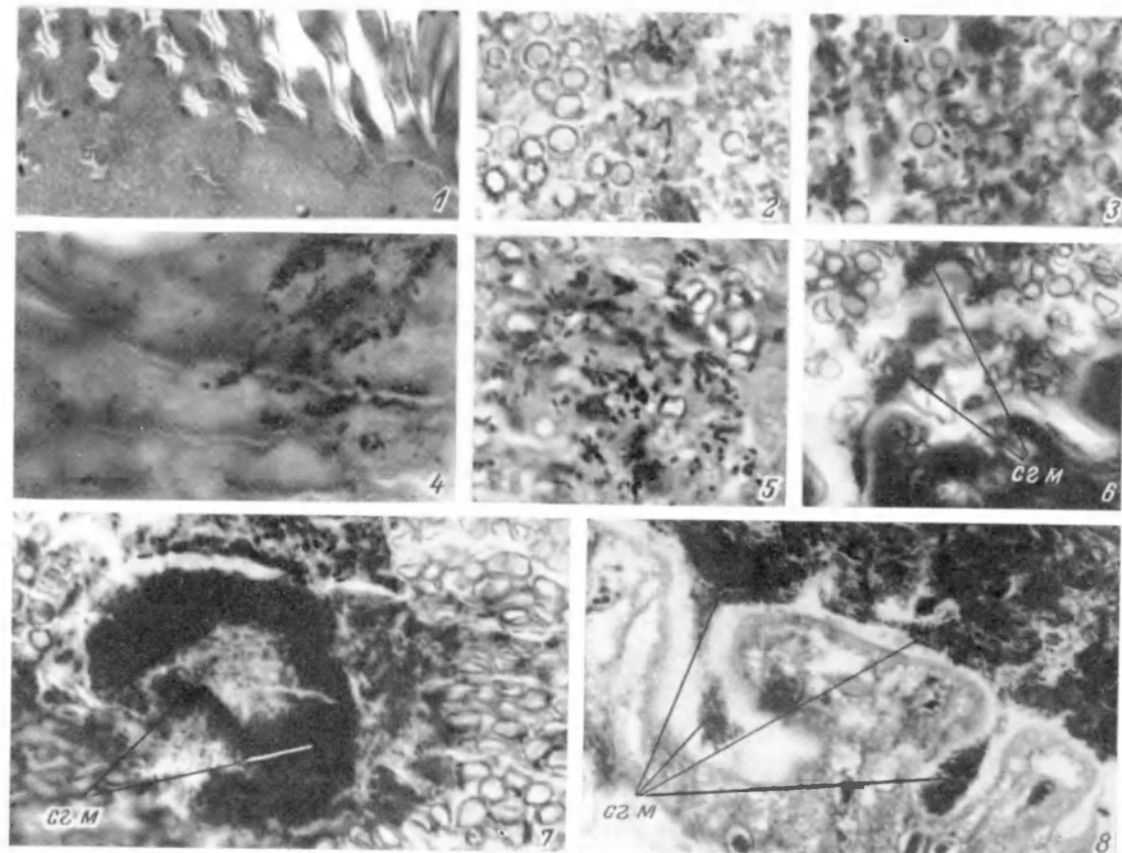
V. S. Vashchenok, V. N. Jakuba, M. P. Maevsky

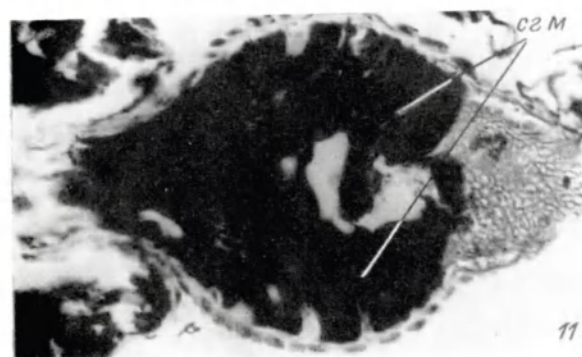
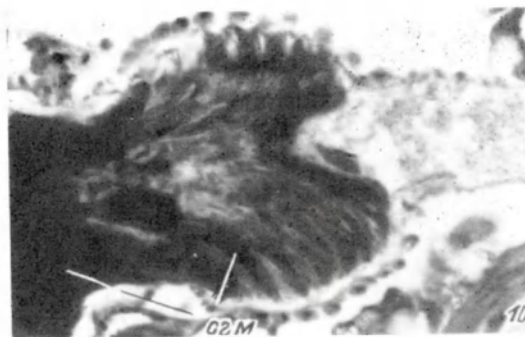
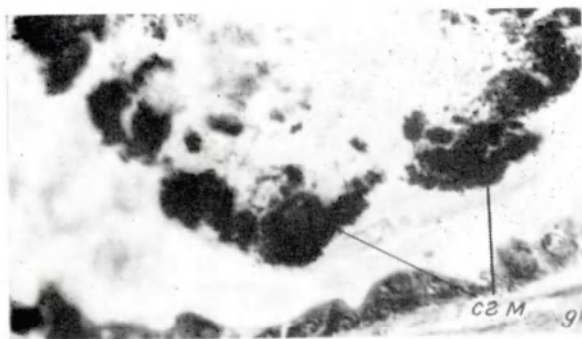
IS U M M A R Y

The plague microbe of the Ulegei subspecies is able to cause the stable infection of fleas of *X. cheopis*, which is accompanied by the formation of «block» in most individuals. The preservation of the plague agent in these ectoparasites is characterized by its variation in the number that undergoes cyclic changes depending on the feeding rate and digestion. The bloodsucking is accompanied by the excretion of some microbes and by the reproduction of the remaining ones in the midgut and proventriculus which lasts the whole 1 st stage while dense clots of erythrocytes are preserved in the intestine. In the course of blood digestion the reproduction of microbes is replaced by their dying off and when the digestion is over the quantity of microbes increases again. In this period small cocci, which form dense clots in the midgut and proventriculus, are the dominant form of microbes.

Чумной микроб улягейского подвида в блохах
X. cheopis.

1 — чумные микробы в содержимом преджелудка в первые часы после заражающего кормления; 2 — то же, в средней кишке; 3 — то же, в ректальной ампуле; 4 — скопления микробов в задней части преджелудка и в полости кардиального клапана в конце I стадии переваривания крови (после заражающего кормления); 5 — то же, в содержимом средней кишки; 6, 7 — сгустки микробов в средней кишке в первые часы после подкормки; 8 — скопления мелких коккобактерий в содержимом средней кишки (2-е сутки после подкормки).





Продолжение рисунка

9 — скопления микробов в периферийных слоях гематина в средней кишке (3-и сутки после подкормки); 10, 11 — преджелудки, «блокированные» сгустками чумных микробов; 12 — то же, видна россыпь микробов в крови. 1—8, 12 — об. 100×; 9—11 — об. 40×; сг м — сгустки микробов.